

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463034

研究課題名(和文) In vitro ヒト顎関節滑膜炎モデルを使用した顎関節症治療薬評価法の開発

研究課題名(英文) Pharmaceutical therapeutic assesment for temporomandibular disorders by using
sinovitis model of human TMJ in vitro

研究代表者

覚道 健治 (KAKUDO, Kenji)

大阪歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：30131379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節症関節円板障害では、クレンチングなどの噛みしめ時に直接滑膜に過度な負荷が加わり滑膜炎が発現する。本研究ではヒト滑膜由来細胞を用いた3次元培養組織に噛みしめ時に相当する繰り返し力学的負荷を加えて滑膜炎モデルを作製し、このモデルに対する薬剤の効果をin vitroで評価するシステムの開発を行った。膝関節鏡手術にて得られたヒト滑膜組織から初代培養を行い、3次元培養組織を作製し各種の顎関節症治療薬を添加し、繰り返し圧縮負荷を与え、炎症マーカーの推移を測定した。顎関節治療薬の効果がin vitroで判定可能であった。

研究成果の概要(英文)：When clenching the teeth, compressive force is applied directly to the synovium in the disc, causing synovitis of temporomandibular disorders (TMJ disc derangement). We have developed a novel synovitis model using a cyclic loading bioreactor, and cultured human synovial cells in a 3D cell-scaffold construct. We studied pharmaceutical agents for temporomandibular disorders by using this model. This system can assess the effects of pharmaceutical agents for TMD in vitro.

研究分野：外科系歯学

キーワード：顎関節症 薬物療法 滑膜炎

1. 研究開始当初の背景

近年顎関節症患者は増加の傾向にあり、国民の顎関節症に対する関心も高まりつつある。痛みを伴う顎関節症は顎関節滑膜炎に起因するといわれている。また、顎関節円板前方転位は臨床においてもっとも多くみられる症例であり、顎関節円板前方転位が発現すると、解剖学的構造上、円板後部結合組織に存在する滑膜に直接噛み締め時の圧縮負荷がかかるといわれている。さらに、夜間噛み締め後の起床時の顎関節痛の増悪は日常臨床でしばしば遭遇する症状の一つである。以上のことから、顎関節滑膜炎細胞に対するメカニカルストレスの関与の結果による炎症反応が疑われてきた。

本研究では現在までに顎関節滑膜炎を初代培養し、得られた培養細胞を滑膜炎由来細胞とし、それをを用いて三次元培養組織を作製し、開発したコンピュータ制御による繰り返し圧縮負荷装置を使用し、ブラキシズムを想定した1日1時間で5～15日間の鉛直繰り返し圧縮負荷刺激に対する細胞応答の検討を行ってきた (Muroi, Kakudo et. al.: J Dent Res 2007, J Osaka Dent Univ 2007)。その結果、繰り返し圧縮負荷により炎症性サイトカインのうち、IL-8, MMP-1, MMP-3の遺伝子発現レベルの上昇がみられ、タンパクレベルでの発現も認められた。さらに、急性期を想定した1時間の圧縮負荷後6時間で、IL-1, IL-6, IL-8, MMP-3およびMMP-9のm-RNAレベルの有意な上昇がみられた (Akamine, Kakudo et. al.: J Osaka Dent Univ 2011, Int J Oral Maxillofac Surg 2011)。以上の本研究で解析した実験系は、*in vitro*における再現性の高いヒト顎関節症の滑膜炎モデルと考えられ、顎関節症に対する薬物動態の解析に応用が可能であることが示唆された。これまで、顎関節症滑膜炎モデルは、*in vivo*ではマウス、ヒツジなどの動物を使用して実験的に発現させた報告があるものの、再現性

が乏しく、遺伝子レベルでの探索や薬物効果の判定にまで至っていなかった。

2. 研究の目的

開発したコンピュータ制御による繰り返し圧縮負荷装置を使用し、三次元培養された滑膜炎由来細胞に対する鉛直繰り返し圧縮負荷刺激で再現された *in vitro* のヒト顎関節滑膜炎モデルを作製し、同モデルを使用した顎関節症治療薬の評価判定システムの開発を行うことを目的に本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* におけるヒト顎関節滑膜炎モデルに対する抗炎症性鎮痛薬 (NSAIDs), COX-2 阻害薬 (CEL), 副腎皮質ステロイド薬およびヒアルロン酸 (HA) の薬効評価

材料：抗炎症性鎮痛薬, COX-2 阻害薬, 副腎皮質ステロイド薬およびヒアルロン酸製剤

方法：膝関節鏡下手術で採取されたヒト膝関節滑膜炎を細切し、初代培養して得られた培養滑膜炎細胞と2%アテロコラーゲンゲルを混和し、上記のアテロコラーゲンスポンジに滴下、遠心力を加えてスポンジ内に注入し、三次元培養組織を作製する。この滑膜炎由来細胞三次元培養組織を材料とし、コンピュータ制御の繰り返し圧縮負荷装置を使用して *In vitro* におけるヒト顎関節滑膜炎モデルを作製し、これに対する抗炎症性鎮痛薬の薬効評価を検討する。

評価：PGE-2 および ADAMTS4 を指標に抑制効果を評価する。

(2) ヒト滑膜炎細胞に及ぼす多血小板血漿 (PRP) の影響

材料：ヒト多血小板血漿 (PRP)

方法：膝関節鏡下手術で採取されたヒト膝関節滑膜炎を細切し、初代培養して得られた培養滑膜炎細胞に、1%aPRP, 5%aPRP, 10%aPRP 及び 20%aPRP を添加し、細胞増殖能を検討した

評価：aPRP, 添加後1日目, 3日目および

び5日目で細胞数を計測し評価した。

(3) ヒト軟骨細胞由来三次元培養組織の軟骨再分化に及ぼす繰り返し圧縮負荷刺激の効果

材料：Olympus RMS より譲与されたヒト膝軟骨由来細胞を使用した。

方法：平面培養にて培養したヒト軟骨由来細胞を1% Atelocollagen gel と混和し、collagen sponge に播種、500G の遠心力を与えヒト軟骨由来三次元培養組織 (5×10^5 cells/scaffold) を作製した。作製した三次元培養組織は2日間静置培養を行い、3日目に BMP2, TGF- β 3 を添加した Chondrogenic medium に変更した。まず実験1として、この三次元培養組織が軟骨へ再分化するか否かを検討するために三次元培養組織を Chondrogenic medium または BMP2, TGF- β 3 を含まない Control medium で28日間培養を行った。次に実験2として、軟骨再分化に及ぼす圧縮負荷刺激の影響を検討するために Chondrogenic medium へ変更後、三次元培養組織に1週間圧縮負荷を与えた。負荷条件は0.5 Hz, 1日1時間で0 kpa または20 kpa とした。1, 4 および7日目の遺伝子解析を行った。統計解析は、Student-*t* test, Tukey-Kramer を用い、有意差 $P < 0.05$ とした。

評価：

実験1：培養1, 4, 7, 14, 21 および28日目に三次元培養組織を回収し、遺伝子解析と組織学的評価を行った。

実験2：1, 4 および7日目の遺伝子解析を行った。統計解析は、Student-*t* test, Tukey-Kramer を用い、有意差 $P < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) *In vitro*におけるヒト顎関節滑膜炎モデルに対する抗炎症性鎮痛薬 (NSAIDs), COX-2 阻害薬 (CEL), 副腎皮質ステロイド薬およびヒアルロン

酸 (HA) の薬効評価

NSAIDs 添加により、圧縮負荷により発現上昇した PGE2 産生が抑制された。CEL は IND より低濃度において、圧縮負荷により発現上昇した ADAMTS-4 遺伝子を抑制した。MMP-3 遺伝子発現は IND 1, 10 μ M 添加を除き、CEL 添加による変化を認めなかった。

副腎皮質ステロイド薬 (デキサメサゾン: DEX) 添加により、濃度依存的に PGE2 産生の抑制が認められた。また、力学負荷により MMP-1, MMP-3, の遺伝子発現は抑制したが、ADAMTS-4, ADAMTS-5 の遺伝子発現は亢進した。

ヒアルロン酸添加により、濃度依存的に PGE2 産生の抑制が認められた。また、力学負荷により MMP-1, MMP-3, ADAMTS-4 の遺伝子発現は亢進したが、ADAMTS-5 の遺伝子発現は変化がなかった。力学負荷により発現が上昇した MMP-3 の遺伝子発現はヒアルロン酸 100 μ g/ml 添加群において発現を有意に抑制され、ADAMTS-4 の遺伝子発現は分子量 600 万ヒアルロン酸の 100, 1000 μ g/ml で有意に抑制された。

(2) ヒト滑膜細胞に及ぼす多血小板血漿 (PRP) の影響

5%, 10%, 20% の異なる濃度の活性化 PRP で比較すると、濃度依存性に滑膜細胞を増殖させることが明らかとなった。

(3) ヒト軟骨細胞由来三次元培養組織の軟骨再分化に及ぼす繰り返し圧縮負荷刺激の効果

実験1において、Chondrogenic medium で培養した場合、4日目ですでに Sox9 および Aggrecan が上昇し、collagen a1 は7日目で上昇を認めた。SafraninO 染色では28日目で内部まで染色されることを確認した。このことより今回使用した三次元培養組織でも軟骨再分化の可能なことが確認できた。また、

実験2の軟骨分化初期に及ぼす繰り返し圧縮負荷では, Sox9 および BMP2 遺伝子発現が20kpa で上昇を認めた。以上の結果より, 軟骨分化初期に及ぼす繰り返し圧縮負荷刺激は軟骨分化を促進させる可能性のあることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- 1) Tomoko Okamoto, Kenji Kakudo, Yuichi Ohnishi, Masahiro Nakajima and Ken Nakata: Effect of cyclic compressive loading on redifferentiation of human chondrocytes in three-dimensional cultured tissue. J Osaka Dent Univ 2017;51(1):23-30. (査読あり)
- 2) Shinya Yatani, Ken Nakata and Kenji Kakudo : Effect of platelet-rich plasma on proliferation of human synovial cells. J Osaka Dent Univ 2016; 50(1):31-35. (査読あり)
- 3) Mayo Kondo, Ken Nakata and Kenji Kakudo : Celecoxib down-regulates mechanically induced ADAMTS-4 gene expression in 3Dcultured tissue of human synovium-derived cells at lower concentration than indomethacin. J Osaka dent Univ 2014;48(1):55-59. (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

- 1) 岡本知子, 大西祐一, 窪 寛仁, 中田 研, 覚道健治. ヒト軟骨細胞由来3次元培養組織の軟骨再分化における繰り返し力学負荷刺激の影響. 第61回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2016.11.25. 千葉市・幕張メッセ.
- 2) Kenji Kakudo, Shinya Yatani, Ken Nakata. Effect of platelet-rich plasma on proliferation of human synovial cells. 23rd Congress of the European Association for Cranio Mxillo-Facial Surgery. 2016.9.13.London. UK.
- 3) Tomoko Okamoto, Yuichi Ohnishi, Ken Nakata, Kenji Kakudo. Differentiation of three dimensional cultured tissue of human chondrocyte by cyclic mechanical stress. 23rd Congress of the European Association for Cranio Mxillo-Facial Surgery. 2016.9.13.London. UK.
- 4) 岡本知子, 矢谷真也, 覚道健治. ヒト軟

骨由来3次元培養組織の軟骨再分化への繰り返し力学刺激による影響. 第70回NPO法人日本口腔科学会総会・学術集会. 2016.4.16.福岡市・福岡国際会議場.

- 5) 岡本知子, 武 泰浩, 下村和範, 前 達雄, 吉川秀樹, 中田 研. 繰り返し力学刺激によるヒト軟骨細胞由来3次元培養組織の軟骨再分化. 第29回日本軟骨代謝学会. 2016.2.20.広島市. 広仁会館.
- 6) 岡本知子, 矢谷真也, 金銅真世, 室井悠里, 覚道健治, 中田 研. ヒト滑膜3次元培養組織へのメカニカルストレスとIL1-, IL6刺激によるPGE2発現上昇. 第60回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2015.10.16.名古屋市. 名古屋国際会議場.
- 7) 矢谷真也, 中田 研, 覚道健治. 多血小板血漿はヒト滑膜細胞の増殖を促進する. 第28回日本顎関節学会総会・学術大会. 2015.7.5.名古屋市. 名古屋国際会議場.
- 8) 岡本知子, 矢谷真也, 金銅真世, 赤峯勇哲, 室井悠里, 覚道健治. ヒト滑膜3次元培養組織への繰り返し力学負荷における発現遺伝子の時間的経過. 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2014.10.17. 千葉市・幕張メッセ.
- 9) 金銅真世, 岡本知子, 矢谷真也, 覚道健治, 3次元培養ヒト滑膜炎モデルにおけるMMPs遺伝子発現に及ぼす抗炎症薬の影響. 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2014.10.17. 千葉市・幕張メッセ.

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 覚道健治 (KAKUDO, Kenji)
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号: 30131379
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者 中田 研 (NAKATA, Ken)
大阪大学・医学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 00283747
- (4) 研究協力者
金銅 真世 (KONDO, Mayo)
矢谷 真也 (YATANI, Shinya)
岡本 知子 (OKAMOTO, Tomoko)